

Promotorlar ve Parazitolojide Kullanımları

Abdullah İNCİ, Ahmet YAVUZ

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Promotorlar, gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde görevli genlerin regülatör bölgesidir. Diğer regülatör bölgelerle uyum içinde çalışarak gen transkripsiyonunu yönetirler. Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde yapısı farklı olan promotorlar günümüzde sağlık problemlerinin çözümü amacıyla hemen tüm bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır. Özellikle kanserli hastaların tedavilerinde genetik bilimcilere yol gösterici olmaktadır. Veteriner ve tıbbi parazitoloji alanlarında promotorlar ile yapılan çalışmalar genellikle protozoon parazitler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu derlemede promotorların parazitolojideki kullanım alanları değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Parazitoloji, promotor, gen transkripsiyonu.

Promoters and their applications in parasitology

Summary: Promoters are regulatory regions of genes which are responsible for gene transcription. With compatible of other regulator regions they facilitate gene transcription. Promoters that have different structures in eukaryotic and prokaryotic cells have been widely used in research to solve the health problems nowadays. They become a guide especially for genetic scientists in the treatment of patients with cancer. In veterinary and medical parasitology, studies of promoters have usually been focused on protozoon parasites. The application of promoters in parasitology were evaluated in this review.

Key words: Parasitology, promoter, gene transcription.

Giriş

Biyolojide promotor, gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde kontrol noktası görevi yapan genin 5' ucuna doğru olan DNA kısmının bir regülatör bölgesidir. Promotor, spesifik DNA sekansları ve transkripsiyon faktörü olan proteinler tarafından tanınan elementleri içerir. Bu transkripsiyon faktörleri, genin kodlanan bölümünden sentezlenen RNA polimeraz enziminin işlevini başlatan promotor sekanslarına bağlanırlar. Promotor, prokaryotlarda RNA polimeraz ve ortak bir sigma faktörü tarafından tanınır. Bu sigma faktörü, promotor DNA'ya kendi DNA sekansına bağlanan bir aktivatör protein tarafından getirilir. Bu olay, ökaryotlarda daha komplike olup RNA polimeraz-II promotorunun transkripsiyonunda en az yedi farklı faktör gereklidir. Promotorlar, bir genin transkripsiyonunu yönetmek amacıyla diğer regülatör bölgelerle (enhancer, silencer, boundary elementleri/insulatorler) uyum içinde çalışırlar. Bu çalışan elementler DNA spesifik değildirler ve aslında bir RNA genomunun 3' ucunda lokalize olurlar (1).

Nisbi Lokalizasyonun İdentifikasyonu

Promotorlar, tipik olarak hemen genlere yapışırlar. Promotor içindeki pozisyonlar RNA transkripsiyonu-

nunun başladığı yer olan transkripsiyonal başlangıç bölgelerini gösterirler (örneğin -100, 100 baz pairlik bir pozisyon anlamına gelir).

Promotor Elementleri

a-) Çekirdek promotor: Transkripsiyonun başlamasına ihtiyaç duyulan promotorun minimal bölgesi olup, transkripsiyon başlangıç bölgesidir (TSS). Bu promotorun ağırlığı yaklaşık olarak 34 bp'dir. Çekirdek promotor, RNA polimeraz için bağlanma bölgesidir. Bu promotora bağlanan RNA polimeraz üç gruba ayrılmakta olup; RNA polimeraz-I: rRNA'yı kodlayan genlerin transkripsiyonunda; RNA polimeraz-II: mRNA ve küçük nükleer RNA'yı kodlayan genlerin transkripsiyonunda; RNA polimeraz-III: tRNA ve diğer küçük RNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonunda görev alırlar. Bu promotor, genel transkripsiyon faktörlerini bağlayan bölge olarak bilinir (1).

b-) Proximal promotor: Primer regülatör elementleri içeren genin proksimal sekans ucu olup, yaklaşık 250 bp ağırlığındadır. Spesifik transkripsiyon faktörü bağlayan bölge olarak bilinir (1).

c-) Distal promotor: Proximal promotorlara göre daha zayıf etki gösteren regülatör elementleri içeren genin distal sekans bölgesi olup daha fazla bağlanma bölgesi taşımaktadır. Enhancer veya etkisi bağımsız olan diğer regülatör bölgeleri kapsamaktadır. Bu promotor da proximal promotor

gibi spesifik transkripsiyon faktörü bağlayan bölgedir (1).

Ökaryotik Promotorlar

Ökaryotik promotorlar çok çeşitli olup bunları karakterize etmek oldukça zordur. Bu promotorlar, genellikle genin 5' ucu boyunca uzanır ve transkripsiyon başlangıç bölgesinden uzakta bulunan çeşitli kilobazlarda elementlere sahiptirler. Ökaryotlarda transkripsiyonel kompleks, DNA'nın kendi etrafında kıvrılmasına sebep olur. Böylece gerçek transkripsiyon bölgesinden uzaktaki regulator sekanslar da yerleşim gösterebilirler. Birçok ökaryotik promotor, bir TATA box (TATAAA sekansı) içerir. Bu box, RNA polimeraz transkripsiyonel kompleksin oluşmasına yardımcı olan TATA proteinini bağlar. TATA box, transkripsiyon başlangıç bölgesine çok yakın olarak (50 baz içerisinde) uzanır. Ökaryotik promotor regulator sekansları, tipik olarak transkripsiyonel kompleks oluşumunda görev alan ve transkripsiyon faktörleri olarak isimlendirilen proteinleri bağlar. Buna bir örnek E-box (CACGTG sekansı) sekansıdır (1).

Prokaryotik Promotorlar

Prokaryotlarda promotorlar, transkripsiyon başlangıç bölgelerinden olan -10 ve -35 bp pozisyonundaki uçlarda bulunan iki kısa sekans meydana gelir. Sigma faktörleri, yalnızca RNAP'ın (RNA polimeraz) promotora bağlanmasına yardımcı olmaz ayrıca RNAP'nın genleri kopyalamasına da yardımcı olurlar. -10 pozisyonundaki sekans, Pribnow box veya -10 elementi olarak isimlendirilir. Bu sekans, genellikle TATAAT'den oluşan 6 nükleotitten meydana gelir. Pribnow box, prokaryotlarda transkripsiyonun başlaması için kesin olarak gereklidir. -35 pozisyonundaki diğer sekans ise genellikle TTGACA'dan oluşan altı nükleotitten meydana gelir. Bu pozisyonun varlığı

transkripsiyon oranının daha yüksek olmasını sağlar (1).

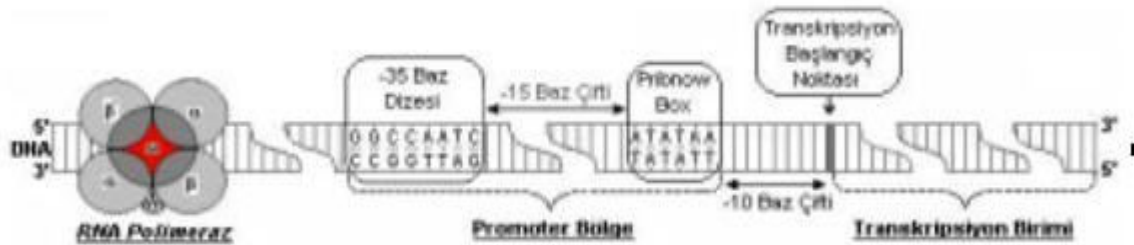
Yukarıdaki her iki sekans da birçok promotorda sağlam ve bütün bir halde bulunmazlar. Her bir sekansdaki 6 bazın sadece 3'ü promotorlarda bulunur. Her iki uçta da sağlam sekanslara sahip promotorlar tanımlanmamıştır. Bu olayın, sigma faktörün çeşitli bağlanmalara sebep olarak, RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmasını engellemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bazı promotorlar, yapısal olarak -35 sekansının uç kısmında UP elementi (5'-TGNTATAAT-3') ihtiva ederler. -35 sekansında bulunan UP elementinin transkripsiyon için fazla bir önemi bulunmamaktadır. -10 ve -35 pozisyonundaki promotorlar yalnızca prokaryotik RNA polimeraz ile etkileşimde bulunan sigma -70 proteini tarafından tanınırlar. Bunun yanında diğer sigma faktörleri ile prokaryotik RNA promotorlardan oluşan kompleksler diğer bütün promotor sekanslarını tanırlar (1).

Promotorların Parazitolojide Kullanımı

Promotor elementler günümüzde sağlık problemlerine ışık tutmak amacıyla hemen hemen tüm bilimsel çalışmalarda kullanılmıştır. Özellikle kanser ve kanserli hastalarda tedavi ile enfeksiyon hastalıklarının tedavilerinde genetik bilimcilere yol gösterici olmuştur. Veteriner ve tıbbi parazitoloji alanında promotor elementler ile yapılan çalışmaların ağırlıklı olarak protozoon parazitler üzerinde yoğunlaştığı dikkat çekicidir (1).

Plasmodium falciparum ile yapılan çalışmada GEMS (Gene Enrichment Motif Searching) adı verilen bir yöntem aracılığı ile parazitin mRNA genomunda parazitin patojenite faktörleri ve yaşam döngüsü üzerinde önemli bilgiler elde edilmiştir (13). Yapılan başka bir çalışmada ise *P. falciparum*'la mücadelede kullanılan ilaçlara karşı oluşan direncin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır.



Şekil 1. RNA polimeraz ve mRNA transkripsiyonu (1)

tır. Bu çalışmada P-glycoprotein homolog 1 geni kullanılmış olup nükleer reseptörlerin ilaca maruz kalan parazitlerde önemli olduğu ortaya konmuştur (4).

Entomobae histolytica ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada fagositoziste önemli rol oynayan EhrabB promotörü ve bu promotörün sentezlediği Rab GTPase üzerinde durulmuştur. Bu çalışmada Ehcp112 geni üzerinde bulunan 332 bp'lik EhrabB promotörünün önemli olduğu vurgulanmıştır (8).

Trypanosoma brucei'nin aktif RNA polimerazı üzerine yapılan çalışmada, birçok yüzey antijeni, glikoprotein ve procyclin'in sentezlenmesinde görev alan RNA polimeraz'ın 9 farklı yapıda protein eksprese ettiği tespit edilmiştir. Bunlardan p31 ile ifade edilen protein yapısının diğerlerinden çok farklı bir yapıya sahip olduğu ortaya konmuştur (7).

Giardia intestinalis'in çekirdek histon geninin ekspirasyonu üzerine yapılan çalışmada transkripsiyon başlangıç noktasından yaklaşık 50 bp'lik uzaklıkta bulunan 1 ila 27 nükleotidlik bir promotör bölgenin bulunduğunu tespit edilmiştir (12).

Toxoplasma gondii'nin ENO1 ve ENO2 gibi iki farklı enolase enziminin sentezlenmesindeki farklılıkların araştırılması üzerine yapılan çalışmada enzimin sentezlenmesinde görev alan promotör bölgelerin ısı şok elementlerinin ve diğer düzenleyici bölgelerin stres altında mutasyona uğrayıp uğramadığı araştırılmıştır (6).

Babesial parazitlerle ilgili olarak yapılan çalışmalarda parazitlerden elde edilen rap-1 genleri arasında intergenic (IG) bölgelerin bulunduğu saptanmıştır. Bu IG bölgelerin rap-1 genini düzenlediği hipotez edilmiştir. *B. bovis*'in rap-1 geninin 5' ucunda iki gen bölgesini birbirinden ayıran IG alan bulunmaktadır. Buna karşın *B. bigemina*'da rap-1 bölgesi en az 5 polimorfik rap-1a gen bölgesi içermektedir. Bu bölgenin karakteristik yapısı tam belli olmamakla beraber 3.38 kb'lık bir ağırlıkta olduğu saptanmıştır. *B. bovis*'in Mo7 biyolojik suşundan elde edilen DNA'nın PCR ile amplikasyonu sonucu, rap-1 geninin 3' sekansını kodlayan bir genomik klon, 1 kb'lık IG alan ve 5' sekansını kodlayan ikinci bir gen elde edilmiştir. Bunu takiben *B. bigemina* rap-1a genlerinde iki farklı IG bölge (IG-1 ve IG-2) saptanmış olup IG-1'in ağırlığı 0.7 kb ve IG-2'nin ağırlığı 1.3 kb olarak sekans edilmiştir. *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. ovis* ve *B. canis*'den elde edilen rap-1 IG bölgelerinin sekans analizleri yapıldığında rap-1'in 5' ucunda en az 3 patatif regülatör bölge olduğu tespit edilmiştir (9).

rap-1 IG bölgesinin fonksiyonel bir promotör olup olmadığını saptamak amacıyla *B. bovis*'ten elde edilen 1 kb'lık IG bölgesi "cat" geni içeren bir plasmide klonlanmıştır. 5' yönünden 3' yönüne doğru olan IG bölge, güçlü şekilde transkripsiyonu başlatmıştır. Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile 5' ucundaki rap-1 genleri, bu genler arasındaki IG bölgeler ve 5' yönünden 3' yönüne doğru olan promotör fonksiyonu, rap-1 geninin düzenlenmesinde IG'nin önemli rol oynadığı kanaatine varılmıştır (5).

Babesia sp. ile yapılan bir diğer çalışmada *Babesia* rap-1 gen ailesindeki üyelerinin, parazitin bütün yaşam dönemlerinden eksprese edildiğini ve bunların transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalar ile düzenlendiği ileri sürülmüştür (10). Bütün *Babesia* türlerinde ard arda gelen rap-1 gen bölgeleri, IG bölgeler ile bölünmektedir. Söz konusu çalışma, *B. bovis* rap-1 IG bölgesinin, merozoitlerden elde edilen ekzojen genlerin ekstrakromozal ekspirasyonunu başlatıp başlatmadığı ve rap-1 bölgesine benzer şekilde IG bölgelerin ard arda sıralanmasının ekzojen genlerin ekspirasyonunu artırıp artırmadığını saptamak amacıyla yapılmış olup luciferase genlerin ekspirasyonu yapılarak *B. bovis*'in elektroporsiyon durumu saptanmıştır. *B. bovis* rap-1 IG bölgelerinin kontrolü altında, hem *B. bovis*'in elektroporsiyonu hem de luciferase genleri içeren plasmidin nakledildiği *E. coli*'nin luciferası eksprese edebildiği görülmüş ve bundan yola çıkarak rap-1 IG bölgesinin fonksiyonel bir promotör içerdiği tespit edilmiştir (10).

B. bovis rap-1 bölgesinin kromozomal dizilimi, baştan sona doğru bir rap-1 gen bölgesi ve ardından bir IG bölge şeklinde oluşmaktadır. *Luc* ve *hdhfr* genlerinin ekspresyonunu kontrol eden iki rap-1 IG bölgesini içeren plasmide, genlerin baştan başa veya baştan kuyruğa doğru olan sıralamasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır. Genler baştan kuyruğa doğru sıralandığında luciferase seviyesinde diğerine göre artış olduğu görülmüştür (11).

Bu sonuçlar, *B. bovis*'in rap-1 IG bölgelerinin in vivo olarak ekstrakromozal gen ekspirasyonunu başlatarak *B. bovis*'ten exogen genlerin elde edilmesinin gösterildiği ilk çalışmadır. Suarez ve ark. (11), yaptıkları bir diğer çalışmada ökaryotik preteinlerin translasyonunda anahtar bir element olan *elongation faktör 1-α* (ef-1α) promotöründen bahsetmişlerdir. Söz konusu çalışmada yüksek transkripsiyon potansiyeline sahip *ef-1α* promotörünün enfekte hayvanlardan ekzojen genlerin elde edilmesinde kullanıldığı bildirmiş olup; yaptıkları çalışmada sığır babesiosisine sebep olan *B.*

bovis'in *ef-1 α* lokusunun karakterinin saptanması ve *ef-1 α* promotorunun transkripsiyon aktivitesinin ölçülmesi amaçlanmıştır. *B. bovis*'in *T2Bo* suşunun *ef-1 α* lokusu, 260bp'lik bir terminal bölge içeren 1.4 kb'lık bir IG bölge ile ayrılan ve uctan uca dizilim gösteren iki *ef-1 α* (A ve B) geni içermektedir. Her iki gen de 448 amino asit kodlamakta olup hesaplanan molekül ağırlıkları 49 kb'dir. IG bölge, her iki genin ekspirasyonunu başlatmaktadır. Hem *ef-1 α* A geninin Ig-A içeren 730 bp'lik ucu hem de *ef-1 α* B geninin Ig-B içeren 720bp'lik ucu lusiferase aktive etmektedirler. 5'-3' diziliminde Ig-B fragmenti en yüksek lusiferase aktivitesini göstermektedir. Bu fragment çok güçlü bir promotor içermektedir. Analiz sonuçlarına göre her iki *ef-1 α* geni de merozoitler içerisinde kopyalanmaktadır. Bu çalışma ile elde edilen önemli bir bulgu ise; diğer intra eritrositer parazitlerin aksine, *B. bovis ef-1 α* lokusunun 5' ucunda 160 bp'lik bir intron bölge bulunmasıdır (11).

Schistosoma mansoni ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada plasmid tabanlı DNA yapı araştırmasında immatur schistosomların gelişmesinde schistosome actin geninin (Smact 1) 3' terminotör sekans bölgesindeki promotorlar aracılığı ile sentezlendiği saptanmıştır (3).

Echinococcus granulosus ile fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, protoskoleksler ile sekonder olarak enfekte edilmiş sekonder hidatidoz olgusunda oluşan immun yanıtın bir model teşkil etmesi ve kist gelişimi üzerine promotorlardan yararlanılmıştır. Çalışmada, kist gelişimi ve oluşan immun yanıtta sitokin geninin ekspirasyonunun etkisi incelenmiştir. Enfeksiyondan sonra 28. günde; INF- δ , IL-12 (Th-1) ve IL-4 (Th-2) taşıyan promotor içeren vektör geni ile fareler intramuskuler olarak enfekte edilmiştir. Enfeksiyondan sonra 22. haftada enfekte farelerdeki kistlerde INF- δ oranında %60 ve IL-12 oranında ise %47 azalma gözlemlenmiştir. Buna karşın IL-4 geni ile enfekte edilen farelerde, kistin kontrol grubu ile kıyaslandığında 6 kat daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. Enfeksiyonun 7. haftasında IL-12 enjekte edilen farelerde parazit spesifik IgG2a oranında pik gözlemlenmiş olup INF- δ enjekte edilen farelerde IgG2a'nın 9. haftadan sonra artmaya başladığı ve enfeksiyonun sonuna kadar düzenli olarak arttığı saptanmıştır. Buna karşın IL-4 enjekte edilen farelerde IgG1'in 9. haftadan sonra artmaya başladığı ve yine enfeksiyonun sonuna kadar düzenli olarak arttığı tespit edilmiş ve farelerde sekonder hidatitozise karşı meydana gelen yüksek düzeyde immun direncin Th 1 yanıtının indüklenmesi ile ilgili olduğu anlaşılmıştır (2).

Sonuç olarak; promotorların hem veteriner hem de tıbbi parazitoloji alanında parazitlerin yaşam döngülerinde gizli kalmış kısımların belirlenmesi, patojenitede önemli rol oynayan faktörlerin sentezlenmesinde görev alan bölgelerin keşfedilmesi ve bu yolla parazitlerin patojenitelerinin azaltılması veya ortadan kaldırılarak zararsız hale getirilmelerinde önemli olacakları şüphesizdir.

Kaynaklar

1. Anon: <http://en.wikipedia.org/wiki/Promoter>.
2. Al-Qaoud KM, Abdel-Hafez SK, 2008. The induction of T helper type 1 response by cytokine gene transfection protects mice against secondary hydatidosis. *Parasitol Res*, 102 (6): 1151-1155.
3. Correnti JM, Jung E, Freitas TC, Pearce EJ, 2007. Transfection of *Schistosoma mansoni* by electroporation and the description of a new promoter sequence for transgene expression. *Int J Parasitol*, 37 (10): 1107-1115.
4. Johnson DJ, Owen A, Plant N, Bray PG, Ward SA, 2008. Drug-regulated gene expression of *Plasmodium falciparum* P-glycoprotein homologue 1: a putative role for nuclear receptors. *Antimicrob Agents Chemother*, 52 (4): 1438-1445.
5. Kemp DJ, Easton KE, Cowman AF, 1984. Accurate transcription of a cloned gene from *Babesia bovis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biochem Parasitol*, 12 (1): 61-67.
6. Kibe MK, Coppin A, Dendouga N, Oria G, Meurice E, Mortuaire M, Madec E, Tomavo S, 2005. Transcriptional regulation of two stage-specifically expressed genes in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res*, 33 (5): 1722-1736.
7. Nguyen TN, Schimanski B, Günzl A, 2007. Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Mol Cell Biol*, 27 (17): 6254-6263.
8. Romero-Diaz M, Gomez C, Lopez-Reves I, Martinez MB, Orozco E, Rodriguez MA, 2007. Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica* EhrabB gene promoter. *BMC Mol Biol*, 20 (8): 82.
9. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, Hines SA, McElwain TF, 1998. Sequence and functional analysis of the intergenic regions separating babesial rhoptry-associated protein-1 (rap-1) genes. *Exp Parasitol*, 90 (2): 189-194.

10. Suarez CE, Palmer GH, LeRoith T, Florin-Christensen M, Crabb B, McElwain TF, 2004. Intergenic regions in the rhoptry associated protein-1 (rap-1) locus promote exogenous gene expression in *Babesia bovis*. *Int J Parasitol*, 34 (10): 1177-1184.
11. Suarez CE, Norimine J, Lacy P McElwain TF, 2006. Characterization and gene expression of *Babesia bovis* elongation factor-1alpha. *Int J Parasitol*, 36 (8): 965-973.
12. Yee J, Tang A, Lau WL, Ritter H, Delport D, Page M, Adam RD, Müller M, Wu G, 2007. Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic organization, promoter structure, and expression. *BMC Mol Biol*, 10 (8): 26.
13. Young JA, Johnson JR, Benner C, Yan SF, Chen K, Le Roch KG, Zhou Y, Winzeler EA, 2008. In silico discovery of transcription regulatory elements in *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*, 9(1): 70.

Yazışma Adresi:

Prof. Dr. Abdullah İNCİ
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı
Tel: 03523392312
e-mail: ainci@erciyes.edu.tr